

# MS 배지 무기물, 당 및 활성탄의 농도가 *Lilium* Oriental Hybrid 'Casa Blanca' 의 기내인편으로부터 자구형성에 미치는 영향

한봉희\* · 예병우 · 구대회 · 고재영  
원예연구소, 초분화육과

## Effect of Inorganic Salts in MS Medium, Sucrose, and Activated Charcoal on Bulblet Formation from *In Vitro* Bulbscales in *Lilium* Oriental Hybrid 'Casa Blanca'

HAN, Bong Hee\* · YAE, Byeong Woo · GOO, Dae Hoe · KO, Jae Young  
Herbaceous & Bulbous Crops Floriculture Division,  
National Horticultural Research Institute, RDA, Suwon, 440-310, Korea

**ABSTRACT** The effects of MS salt strength, sucrose, and cultural conditions on bulblet formation and growth were investigated to optimize the conditions for micropropagating bulblets from *In vitro* bulb scales of *Lilium* Oriental Hybrid 'Casa Blanca'. There was no difference on bulblet formation in the range of  $1/2 \sim 2 \times$  strength of MS salt, but it was inhibited remarkably in  $3 \times$  strength of MS salt. The growth of regenerated bulblets was most stimulated on MS basal medium. Favorable bulblet formation and its growth from bulb scales were achieved when grown on the media with 1 : 2 or 1 : 3 in the ratio of  $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ , as well as on MS basal medium ( $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^- =$  about 1 : 2). Therefore, MS basal medium was very suitable for bulblet formation and growth from bulb scales. Bulblet formation was inhibited but its growth was stimulated with increase sucrose concentration in the medium. The growth of regenerated bulblets was very effective on the media with 9~12% sucrose. Addition of activated charcoal (AC) to the medium inhibited bulblet formation from bulb scales, but enhanced the growth of regenerated bulblets. Especially, the medium containing 1 g/L AC was most effective on the growth of bulblets. No difference was found on bulblet formation and growth from bulb scales under light and dark conditions. *In vitro* micropropagation of *L. Oriental Hybrid 'Casa Blanca'* was supposed very reasonable to enhance the growth of the bulblets after forming of bulblets from *in vitro* bulb scales, and then, subculture the bulb scales from the grown bulblets on MS medium with 9% sucrose and 1 g/L AC.

**Key words:** Bulblet growth, cultural condition, *in vitro* propagation

### 서론

조직배양에 의한 나리의 번식은 대부분 식물체의 많은 부

분, 즉 인편, 엽, 경정, 화병, 자방, 수술 등으로부터 부정아를 형성하는 데 기초를 두고 있다 (Niimi and Watanabe 1982; Niimi 1984; Stanilova et al. 1994). 이 중 인편에서 부정아를 직접 유기시키는 방법이 몇몇 연구팀에 의하여 철저하고 광범위하게 연구되어 왔으며, 인편배양에 의한 부정아의 형성은 절편체에서 많은 자구를 생산하고 형성된 자구를 빠르게 비대시키는 데 목적을 두었다 (Stimart and Ascher 1978; Van

\*Corresponding author. Tel 0331-240-3640  
Fax 0331-240-3556

Aartrijk and Blom-Barnhoon 1981; Leshem et al. 1982). Takayama와 Misawa (1979; 1980; 1982)는 오염을 피하고, 절편체로부터 가능한 한 많은 자구를 분화시키기 위하여는 기내에서 배양된 자구의 인편을 재배양하는 것이 효율적이라고 발표하였다. 그러나 기내 인편배양에 의한 나리의 증식은 절편체당 자구수가 적고 (Niimi and Onozawa 1977), 생산된 자구가 작으며, 자구가 충분하게 성숙하기까지는 3~4개월 (Niimi 1984; Takayama and Misawa 1979)의 긴 기간이 소요된다. 또한 Higgins와 Stimart (1990)는 조직배양에서 생산된 자구의 크기가 작아 약 2~5년의 양구기간이 소요되기 때문에 개화기까지 비대기간을 단축시키는 문제는 매우 중요하다고 발표하여, 기내배양에서 생산되는 자구의 크기가 포장에서 양구기간을 감소시키는 데 매우 중요하다는 것을 시사하였다.

따라서 본 실험은 *Lilium Oriental Hybrid 'Casa Blanca'*의 기내배양시 인편에서 자구의 형성 및 비대에 미치는 당 및 활성탄의 효과, MS 배지의 염류농도와  $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ 의 비율, 배양에서 광도의 영향을 조사하기 위하여 실시하였다.

## 재료 및 방법

공시재료는 MS 기본배지에 당이 3%가 첨가된 배지에서 배양되고 있는 *Lilium Oriental Hybrid 'Casa Blanca'*의 인편 (약  $5 \times 7 \text{ mm}$ )을 이용하였으며 배지는 MS 기본배지 (Murashige and Skoog 1962)를 사용하였다. MS 배지의 무기염류 농도를 1/2~3배까지 조절하였고  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 와  $\text{NaNO}_3$ 를 질소공급원으로 하여 배지내  $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ 의 비율이 인편에서 자구의 형성과 비대에 미치는 효과를 조사하였다. 배지내  $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ 의 비율은 배지의 총 질소농도를 60 mM로 산정한 다음 mol 농도로 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3의 비율을 나누었고 비율별로 부족한 양을 첨가하였다. 또한 당 (3~12%), 활성탄 (0~5 g/L) 및 명, 암배양조건이 기내인편에서 자구의 형성과 비대에 미치는 영향도 조사하였다.

기내에서 재생된 인편을 300 mL 삼각 후라스코에 13개씩 배양하여 처리당 3개의 flask로 3반복하였고, 배양 12주 후에 자구 형성수, 자구직경, 자구무게 등을 조사하였으며, 배양은  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 조절되는 배양실에서 명 ( $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 16

h), 또는 암배양하였다.

## 결과 및 고찰

MS 배지의 무기염류 농도를 달리하여 인편을 12주간 배양한 결과 (Table 1), 생성된 자구수는 MS배지 농도에 따라 자구형성에 거의 차이를 나타내지 않았으나 3배 염류농도에서는 자구수가 급격히 감소하여 자구의 형성이 억제되었다. 자구직경, 절편체당 총자구 무게 및 구당 자구 무게가 MS 기본배지에서 가장 높아 자구의 비대가 MS 기본배지에서 촉진되었다. 따라서 MS 기본배지가 자구의 형성 및 비대에 양호한 것으로 나타났다.

Takayama와 Misawa (1979)는 *L. auratum* Lindl.의 인편배양에서 MS 배지의 2배 염류농도까지 인편에서 분화된 자구수와 자구의 무게는 MS 배지의 염류농도가 높아질수록 증가한다고 하였으며, Van Aartrijk와 Blom-Barnhoorn (1980)은 *L. speciosum 'Rubrum'*의 인편배양시 낮은 농도의 MS 배지에서는 자구의 형성이 증가하지만 1/2 MS 염류농도 이상에서는 더 이상의 증가는 없었고, 자구의 비대는 1/4 MS 이상의 염류농도에서 촉진되어 인편에서 소식물체의 재생은 적어도 1/2 이상의 MS 염류농도가 요구된다고 하였다. 본 실험에서는 1/2~2배 MS 염류농도 사이에서 자구 수는 차이를 나타내지 않아 Van Aartrijk와 Blom-Barnhoorn (1980)의 결과와 일치하였고 자구 무게도 1/2 MS 염류농도보다는 1~2배 MS 염류농도에서 증가하여 Takayama와 Misawa (1979)의 연구결과와 유사하였다.

$\text{NH}_4^+$  공급원으로  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를,  $\text{NO}_3^-$ 의 공급원으로  $\text{NaNO}_3$ 를 사용하여 MS 배지의  $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ 의 비율이 자구의 형성 및 비대에 미치는 영향을 조사한 결과 (Table 2), 자구수는 MS 배지가 2.4개로 가장 많았으며, 자구직경은  $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ 의 비율이 20 mM : 40 mM과 15 mM : 45 mM, MS 배지가 7.9~8.9 mm로 높았으며, 자구무게도 260~294 mg으로 무거웠다. 따라서 MS 배지 ( $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^- = \text{약 } 20 \text{ mM} : 40 \text{ mM}$ )에서 자구수 및 자구무게가 높아 인편에서 자구의 형성 및 비대는 MS 기본배지가 적절하였다. Polizotto 등 (1975)은 감자를 수경배양하였을 때, 식물체의 생육은  $\text{NO}_3\text{-N}$ 과 비교하여  $\text{NH}_4\text{-N}$ 에 의하여 억제되었다고 하였고, Chen과 Li (1978)는 감자

**Table 1.** Effects of MS salt concentrations on the formation and growth of bulblets from *in vitro* bulb scales of *L. Oriental Hybrid 'Casa Blanca'* after 12 weeks of culture.

MS salt concentration	No. bulblets (ea/explant)	Diameter of bulblet (mm)	Total fresh wt. of bulblets (mg/explant)	Fresh wt. of bulblet (mg/ea)
1/2 ×	2.3 ± 0.4	5.8 ± 0.4	208.2 ± 59.3	86.7 ± 23.1
1 ×	2.3 ± 0.2	6.0 ± 0.3	334.5 ± 62.4	144.8 ± 11.5
2 ×	2.4 ± 0.3	6.1 ± 0.3	280.5 ± 19.6	117.6 ± 11.9
3 ×	0.7 ± 0.3	4.3 ± 1.1	72.1 ± 5.7	83.2 ± 34.3

조직배양에서  $\text{NH}_4^+$ 의 농도가 높을수록 식물체가 느리게 성장하였다고 발표하였다. Lee 등 (1995)은 *L. longiflorum*의 자구형성에서 자구분화는 MS 배지의 질소량을 그대로 유지하는 경우가 다소 좋았으나, 자구의 비대는  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 가 절반으로 감소된 배지에서 양호하다고 하였다.

본 실험에서도  $\text{NH}_4^+$ 의 농도가  $\text{NO}_3^-$ 에 비하여 높을 때는 자구 수와 구당 자구 무게도 현저히 감소하였다. 따라서 나리의 인편에서 자구의 형성과 비대는 MS 배지내의  $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ 의 비율을 20 mM : 40 mM과 15 mM : 45 mM로 조절하거나, 또는 MS 기본배지 ( $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^- = \text{약 } 20 \text{ mM} : 40 \text{ mM}$ )를 사용하는 것이 적합하다고 생각되었다.

당 3%가 첨가된 배지에서는 자구 수가 2.3개였으나 당 6~12%가 첨가된 배지에서는 1.6~1.9개로 자구 수가 감소하였다. 그러나 당 9~12% 첨가배지에서 자구 수 1.6~1.9개, 자구직경 7.3 mm, 절편체당 총자구 생체중 482~480 mg, 구당 자구무게 248~292 mg으로 자구비대가 양호하였다 (Table 3).

Van Aartrijk와 Blom-Barnhoorn (1980)은 *Lilium speciosum* 'Rubrum'의 인편배양에서 당은 식물체의 전분축적을 위한 중요한 탄수화물 공급원이기 때문에 자구형성 및 비대에 필수적인 요소라는 것을 입증하였다. Takyama와 Misawa (1979)는 *L. auratum*과 *L. speciosum*의 배양에서 MS배지에서 당농도가 증가할수록 자구 무게도 비례하여 증가하였으며 9% 또는 12%의 당이 첨가된 배지에서 최대의 생육을 얻을 수 있었지만 자구 수는 차이를 나타내지 않았다고 보고하였고, Niimi와 Onozawa (1979)는 *L. rubellum* Baker의 엽배양에서 4%의 당이 자구형성에 가장 좋았으며, 당농도가 8~

12%로 높아지면 자구형성은 억제되고 자구비대는 촉진된다고 발표하여 본 실험의 결과와 일치하였다.

배지내 활성탄의 첨가는 인편에서 자구의 형성을 억제하였으나 형성된 자구의 비대는 촉진하였다. 특히 활성탄 1 g/L를 첨가한 배지가 자구의 비대에 가장 효과적이었다. 그러나 활성탄 5 g/L 첨가배지에서는 자구무게가 대조구보다도 작아 자구의 비대가 억제되었다 (Table 4).

Takayama와 Misama (1980)는 배지내 활성탄의 첨가 (5 g/L)는 *L. auratum* Lindl.의 인편에서 자구나 인편분화에 관한 BA의 효과를 감소시켜 자구의 형성을 억제하였으며, 생장 억제물질을 결합, 흡착시킴으로써 자구의 비대를 현저하게 증가시켰다고 보고하였다. 본 시험에서도 배지내 활성탄의 첨가는 인편에서 자구의 형성을 억제하였으나, 자구비대를 촉진하였고, 자구비대의 적정농도는 활성탄 1.0~2.0 g/L이었다 (Table 4).

인편을 명, 암조건하에서 12주 동안 배양한 결과 (Table 5), 자구의 형성 및 비대 모두 명, 암배양간에 차이를 나타내지 않았다.

나리의 기내배양에서 부정아 형성에 미치는 광의 영향에 대하여는 상반된 결과가 보고되었다. Lashem 등 (1982)은 *L. longifolium* 배양에서 암배양은 부정아 형성을 감소시킨다고 보고한 반면, Stimart와 Ascher (1978), Novak과 Petru (1981)는 암배양에서 부정아 형성이 촉진된다고 발표하였으며, Takayama와 Misawa (1979)는 *L. auratum* Lindl.과 *L. speciosum* Thunb.의 인편 배양에서 기관형성에 미치는 광의 효과는 분명하지 않았다고 보고하였다. Niimi와 Onozawa (1979)는 *L. rubellum* Baker의 엽절편 배양에서 자구 수는

**Table 2.** Effects of  $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$  ratio in MS medium on the formation and growth of bulblets from *in vitro* bulb scales of *L. Oriental Hybrid* 'Casa Blanca' after 12 weeks in culture.

$\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ ratio (mM)	No. of bulblets (ea/explant)	Diameter of bulblet (mm)	Fresh wt. of bulblet (mg/ea)
MS medium	2.4 ± 0.3	8.8 ± 0.6	284.4 ± 33.1
45 : 15	1.3 ± 0.4	4.2 ± 1.5	64.7 ± 16.6
40 : 20	1.6 ± 0.6	3.2 ± 1.1	74.1 ± 22.3
30 : 30	1.4 ± 0.2	4.6 ± 0.4	85.9 ± 19.8
20 : 40	1.8 ± 0.3	7.9 ± 0.4	260.2 ± 14.2
15 : 45	1.8 ± 0.2	8.9 ± 0.5	294.3 ± 11.6

**Table 4.** Effects of activated charcoal concentration on the formation and growth of bulblets from *in vitro* bulb scales of *L. Oriental Hybrid* 'Casa Blanca' after 12 weeks in culture.

Activated charcoal (g/L) <sup>a</sup>	No. of bulblets (ea/explant)	Diameter of bulblet (mm)	Fresh wt. of bulblet (mg/ea)
0.0	2.5 ± 0.7	6.6 ± 0.8	170.8 ± 33.2
0.5	1.6 ± 0.2	7.9 ± 0.7	235.6 ± 52.7
1.0	1.1 ± 0.6	8.3 ± 1.1	348.2 ± 59.5
2.0	1.0 ± 0.5	7.2 ± 2.1	310.6 ± 37.2
3.0	1.3 ± 0.7	7.1 ± 1.6	210.0 ± 55.8
5.0	1.2 ± 0.7	7.4 ± 0.6	138.4 ± 76.0

<sup>a</sup>MS basal medium contained 6% sucrose.

**Table 3.** Effects of sucrose concentrations on the formation and growth of bulblets from *in vitro* bulb scales of *L. Oriental Hybrid* 'Casa Blanca' after 12 weeks in culture.

Sucrose (%)	No. of bulblets (ea/explant)	Diameter of bulblet (mm)	Total fresh wt. of bulblets (mg/explant)	Fresh wt. of bulblet (mg/ea)
3	2.3 ± 0.2	6.0 ± 0.3	234.3 ± 62.1	101.4 ± 18.7
6	1.7 ± 0.6	7.1 ± 0.2	373.6 ± 31.5	219.8 ± 11.5
9	1.6 ± 0.3	7.3 ± 0.4	479.8 ± 36.5	292.6 ± 12.3
12	1.9 ± 0.1	7.3 ± 0.3	482.2 ± 48.3	248.6 ± 11.5

**Table 5.** Effects of light or dark on the formation and growth of bulblets from *in vitro* bulb scales of *L. Oriental Hybrid 'Casa Blanca'* after 12 weeks in culture.

Cultural condition <sup>a</sup>	No. of bulblets (ea/explant)	Diameter of bulblet (mm)	Fresh wt. of bulblet (mg/ea)	No. of bulbscales (ea/bulblet)
Light	1.8 ± 0.3	8.0 ± 1.0	340.4 ± 71.7	4.8 ± 0.3
Dark	1.8 ± 0.2	8.6 ± 0.4	342.6 ± 20.0	4.8 ± 0.1

<sup>a</sup>MS basal medium contained 9% sucrose.

암배양이 많았으나 암배양에서 평균 자구 무게는 명배양과 차이가 없어 자구의 형성과 비대에 광은 불필요하다고 발표하였다. 이러한 상반된 결과는 배양재료의 상태 및 성장조절제의 첨가여부에 따라 차이가 있는 것으로 생각되었다. 본 실험에서는 성장조절제를 첨가하지 않고 인편에서 자구를 형성 및 비대시키는 데는 명, 암배양에 차이가 없는 것으로 관찰되었다.

## 적 요

*Lilium* oriental hybrid 'Casa Blanca'의 기내인편에서 자구를 대량생산하기 위하여 MS 배지의 염류농도 및 당, 광조건 등이 자구의 형성 및 비대에 미치는 영향을 조사하였다. MS 배지의 1/2~2배 염류농도에서 자구의 형성은 차이를 나타내지 않았으나 3배 염류농도에서 자구의 형성이 현저히 억제되었다. 자구의 비대는 MS 기본배지에서 가장 촉진되었다. 배지의  $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ 의 비율이 1 : 2와 1 : 3일 때, 또는 MS 기본배지 ( $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^- = \text{약 } 1 : 2$ )가 인편에서 자구의 형성 및 비대에 적절하였다. 따라서 MS 기본배지가 자구의 형성 및 비대에 양호한 것으로 나타났다. 당의 농도가 높아지면 자구 형성은 억제되고 자구비대는 촉진되었으며, 당 9~12% 첨가 배지에서 자구비대가 양호하였다. 배지내 활성탄의 첨가는 인편에서 자구의 형성을 억제하였으나 형성된 자구의 비대는 촉진하였다. 특히 활성탄 1 g/L를 첨가한 배지가 자구의 비대에 가장 효과적이었다. 자구의 형성 및 형성된 자구의 비대는 명, 암간에 차이를 나타내지 않았다. 따라서 *L. Oriental Hybrid 'Casa Blanca'*의 기내 대량번식은 당 9%와 활성탄 1 g/L가 첨가된 MS 기본배지에서 기내인편을 배양하여 자구를 형성 및 비대시키고 형성된 자구의 인편을 계대배양하는 것이 효율적이었다.

## 인용문헌

- Chen HH, Li PH (1978) Potato growth and development in relation to  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  forms of nitrogen sources. *Amer Potato J* 55:467-469
- Higgins WS, Stimart DP (1990) Influence of *in vitro* generation

- temperature and post-*in vitro* cold storage duration on growth response of *Lilium longiflorum* bulblets. *J Amer Soc Hort Sci* 115:930-933
- Lee EM, Chung HJ, Lee YB (1995) Regeneration of bulblets from bulblet derived bulbscales of *Lilium longiflorum*. *Kor J Plant Tiss Cult* 22:89-93
- Leshem B, Lilien-Kipnis H, Steinitz B (1982) The effect of light and of explant orientation on the regeneration and subsequent growth of bulblets on *Lilium longiflorum* Thunb. bulb-scale sections cultured *in vitro*. *Sci Hort* 17:129-136
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497
- Niimi Y (1984) Bulblet productivity of explants from scales, leaves, stems and petals of *Lilium rubellum* Barker. *Sci Hort* 22:391-394
- Niimi Y, Onozawa T (1977) Vegetative propagation of *L. rubellum* Barker; Comparison of bulblet formation between scaling and scale segment cultured *in vitro*. Abstracts. Fall Meeting Jap Soc Hort Sci, pp 348-349
- Niimi Y, Onozawa T (1979) *In vitro* bulblet formation from leaf segments of lilies, especially *Lilium rubellum* Barker. *Sci Hort* 11:379-389
- Niimi Y, Watanabe H (1982) *in vitro* propagation of *Lilium rubellum* Barker : Especially on bulblet formation of stem segments. *J Jap Soc Hort Sci* 51:344-349
- Novak FJ, Petru E (1981) Tissue culture propagation of *Lilium* hybrids. *Sci Hort* 14:191-199
- Polizotto KR, Wilcox GE, Jones CM (1975) Response of growth and mineral composition of potato to nitrate and ammonium nitrogen. *J Amer Soc Hort Sci* 100:165-168
- Stanilova MI, Ilcheva VP, Zagarska NA (1994) Morphogenetic potential and *in vitro* micropropagation of endangered plant species *Leucojum aestivum* L. and *Lilium rhodopaeum* Delip. *Plant Cell Rep* 13:451-453
- Stimart DP, Ascher PD (1978) Tissue culture of bulb-scale sections for asexual propagation of *Lilium longiflorum* Thunb. *J Amer Soc Hort Sci* 103:182-184
- Takayama S, Misawa M (1979) Differentiation in *Lilium* bulbscales grown *in vitro*. Effect of various cultural conditions. *Physiol Plant* 46:184-190
- Takayama S, Misawa M (1980) Differentiation in *Lilium* bulbscales grown *in vitro*. Effect of activated charcoal, physiological age of

- bulbs and sucrose concentrations on differentiation and scale leaf formation *in vitro*. *Physiol Plant* **48**:121-125
- Takayama S, Misawa M** (1982) Regulation of organ formation by cytokinin and auxin in *Lilium* bulb scales grown *in vitro*. *Plant Cell Physiol* **23**:67-74
- Van Aartrijk J, Blom-Barnhoorn GJ** (1980) Effect of sucrose, mineral salts, and some organic substances on the adventitious regulation *in vitro* of plantlets from bulb-scale Tissof *Lilium speciosm* 'Rubrum'. *Acta Hort* **109**:297-301
- Van Aartrijk J, Blom-Barhoorn GJ** (1981) Adventitious bud formation from bulb scale explants of *Lilium speciosum* Thunb. *in vitro*. Effect of wounding, TIBA, and temperature. *Z Pflanzenphysiol* **110**:355-363

(접수일자 1999년 1월 8일)